Dott. ALESSANDRO LUSTIG
Direttore dell' Istituto di Patologia Generale Sperimentale presso la
Facoltà Medica di Firenze

# I NUCLEOPROTEIDI BACTERICI
# E LORO PROPRIETÁ IMMUNIZZANTI

EXTRACTO DE LA «REVISTA DE LA SOCIEDAD MÉDICA ARGENTINA»
PÁG. 193, 1910

BUENOS AIRES
«LA SEMANA MÉDICA», IMP. DE OBRAS DE E. SPINELLI
737 — Callao —737
1910

Dott. ALESSANDRO LUSTIG

Direttore dell'Istituto di Patologia Generale Sperimentale presso la Facoltà Medica di Firenze

# I NUCLEOPROTEIDI BACTERICI

# E LORO PROPRIETÁ IMMUNIZZANTI

EXTRACTO DE LA «REVISTA DE LA SOCIEDAD MÉDICA ARGENTINA»

PÁG. 193, 1910

BUENOS AIRES

«LA SEMANA MÉDICA», IMP. DE OBRAS DE E. SPINELLI

737 — Callao —737

1910

# I NUCLEOPROTEIDI BACTERICI E LORO PROPRIETÁ IMMUNIZZANTI

Per il Prof. Dott. ALESSANDRO LUSTIG

Direttore dell'Istituto di Patologia Generale Sperimentale presso la Facoltà Medica di Firenze

---

Da quando Yenner introdusse il suo metodo di immunizzazione attiva mediante un virus attenuato, è passato .più di un secolo e la pratica della vaccinazione si è andata sempre estendendo nelle sue applicazioni; i metodi vaccinali andarono di pari passo sempre piú perfezionandosi, mentre si approfondivano, in modo meraviglioso e geniale, i principî teorici sul meccanismo dell'immunità.

Anche molto tempo dopo la scoperta di Yenner, il sommo Pasteur credeva sempre che, a produrre quell'insieme di reazioni dell'organismo, che si comprendono sotto il nome di reazioni di immunità, occorresse un virus vivo, sebbene attenuato, e su tal principio si basano le vaccinazioni anticarbonchiose, e anche, certi processi di immunizzazione attiva più recenti, ad esempio, quello del tutto empirico di Haffkine contro il colera e contro la peste.

Però sono trascorsi ormai quasi due lustri dacchè le ricerche

Nota.—Le recentissime ricerche di Much sulla nastina tenderebbero a far ammettere che anche certi lipoidi o combinazioni proteico-lipoidali possono funzionare da antigeni.

del Poutsaint, di Salmon, Smith, di Chamberland e Roux, hanno gradatamente dimostrato che la vitalità del virus non è necessaria a dare origine ai fenomeni di immunizzazione, e così hanno posto i principî fondamentali della vaccinazione come reggono ancor oggi.

E cosí si è potuto constatare la possibilitá di immunizzare l'uomo e gli animali anche con corpi bacterici morti, con filtrati di colture, anzi, anche con singoli prodotti bacterici e con constituenti della cellula bacterica.

I progressi della dottrina dell'immunità, hanno condotto ormai a una concezione del fenomeno della immunizzazione che si basa sui principî generali di biologia, che fa comparire il fenomeno in questione come una manifestazione parziale e singola di leggi più complessive e generali.

I vaccini, siano essi dati da virus vivo o morto, da prodotti solubili o costituenti della cellula bacterica, rientrano nella grande classe degli *antigeni*, di quelle sostanze cioé, che sono capaci di generare *anticorpi* rispetto ad essi specifici, per un meccanismo che Ehrlich ha dilucidado colla sua celebre teoria detta delle catene laterali.

Allo stato attuale della scienza conviene ammettere che gli antigeni sono sempre corpi proteici, con carattere di colloidi, siano essi rappresentati da materiali figurati (elementi cellulari) o da materiale amorfo, appartenenti al regno animale o vegetale.

Ma quello che unicamente caratterizza gli antigeni è di essere dotati di speciali elementi distributivi che dirigono la loro azione nell'organismo e che li differenziano da altre sostanze, tossiche o no, che la farmacologia ci fa conoscere.

Queste ultime, come per esempio gli alcaloidi, sali, ecc., introdotte nell'organismo, vi si diffondono secondo comuni leggi di solubilitá, diffusione, osmosi; non sono attratte a fissarsi su particolari gruppi atomici del protoplasma vivente. Invece molte sostanze nutritive complesse e quell' insieme di corpi che si chiamano antigeni, si distinguono per la presenza a loro riguardo di momenti distributivi speciali, diretti da affinità chimiche massimali, onde questi corpi si legano in combinazione assai fissa, non reversibile che nelle prime fasi del processo, a speciali gruppi atomici del protoplasma, i così detti ricettori (Ehrlich). Alla fissazione sui ricettori tien luogo secondo la concezione di Ehrlich, *la rigenerazione in eccesso* di questi e *la messa in circolo* dei ricettori sovrabbondanti che non sono altro che gli anticorpi.

La teoría di Ehrlich è ormai troppo nota, per cui non é quì il caso di esporla, solo mi preme mettere in evidenza come, secondo questa teoria, gli effetti della terapia vaccinale consistano solamente in un cambiamento del momento distributivo degli antigeni, quando questi antigeni sono sostanze, come i bacteri e le loro tossine, dannose all'organismo. Infatti, la presenza in circolo degli anticorpi prodotti dalla immunizzazione, non ha altro effetto che d'impedire agli antigeni di fissarsi sui ricettori dei tessuti e di produrre quindi i loro effetti nocivi, in punti che questi antigeni, tossine o cellule bacteriche sono legati più in circolo dai ricettori iperrigenerati e funzionanti da anticorpi.

Questi anticorpi sono di svariata natura ed azione: noi abbiamo i più semplici nelle *antitossine*, che non fanno che legare e pertanto neutralizzare la tossina, e che hanno delle grandi ana-

logie cogli *antifermenti;* abbiamo gli anticorpi *cito* o *bacteriolitici,* che, di struttura complessa, si legano alle cellule estranee all'organismo, ai bacteri funzionanti da antigeni e su questi esercitano un'azione litica, distruggitrice; abbiamo anticorpi che del pari si fissano sugli elementi cellulari e li preparano alla fagocitosi, le così dette *opsonine* (Wright) e *bacteriotropine* (Neufeld); anticorpi infine che producono speciali alterazioni fisico-chimiche degli antigeni, come le *agglutinine* e *precipitine.* Non bisogna però, credere che tutte queste diverse specie di anticorpi abbiano un significato ed un'importanza eguale nella difesa dell'organismo. Si può anzi dire che un potere veramente difensivo spetta soltanto alle antitossine, alle sostanze opsonizzanti e bacteriotropiche e, forse non sempre alle bacteriolisine; mentre le precipitine e le agglutinine non sembrano avere importanza alcuna nella protezione dell'organismo dalle malattie infettive. È un errore considerare le reazioni di immunità da un punto de vista teleologico: esse hanno luogo, come di fronte a bacteri, così anche a varî elementi collulari, estranei all'organismo, ma bene spesso innocui: anzi lo studio delle *emolisine* (citolisine formantisi contro gli eritrociti come antigeni), serve come di paradigma per lo studio dei fenomeni immunitarî, data la relativa semplicità della tecnica e la possibilità di seguire in vitro una quantità di reazioni. D'altro lato si conoscono condizioni, in cui l'organismo risponde all'introduzione di materiale eterogeneo con manifestazioni di ipersensibilità: intendo con questo accennare ai fenomeni di *anafilassi,* così studiati e discussi in questi ultimi quattro o cinque anni, ed in cui, secondo il paparere dei più autorevoli ricercatori (Otto, Besredka), pare che si abbia a fare pure con un caso speciale della gran legge della

formazione di anticorpi. Anzi, secondo una recente e geniale teoria di Friedberger, con una speciale configurazione del processo di produzione delle precipitine, con formazione di precipitine sessili, con un caso quindi, ove la peculiare localizzazione degli anticorpi sarebbe soltanto la causa del modo singolare di reagire dell' organismo con fenomeni cioè di ipersensibilità talora gravi e anche mortali invece che con una aumentata resistenza. È anzi in base a tali fatti e per evitare ogni prevenzione teleologica che sarebbe bene invece che di fenomeni di immunità in genere, parlare di fenomeni di modificata reattività dell' organismo, o, come dicono V. Pirquet e Schick, di *allergia*. Questo termine è più comprensivo; abbraccia tutte queste importanti manifestazioni biologiche, che in fondo non costituiscono secondo Ehrlich che un capitolo speciale della fisiología della nutrizione, qualunque ne sia la loro pratica utilitá per l'organismo.

Questo sguardo generale, sebbene forse troppo breve e succinto, era necessario per definire quali devono essere gli *scopi di una vaccinazione veramente utile*. Una vaccinazione, per corrispondere allo scopo, deve produrre nell' organismo l' accumulo di anticorpi, ma di quegli anticorpi che sono veramente utili nel caso speciale della lotta contro un dato microrganismo: antitossine, sostanze opsoniche e litiche. E, siccome diverse sono le armi di offesa dei varî microrganismi, diverse devono configurarsi le armi di difesa, se si vuole avere una terapia veramente efficace, *parassitotropa* (Ehrlich); e la vaccinazione deve essere, in uno colla sieroterapia, la terapia parassitotropa per eccellenza.

Vi sono dei bacteri che agiscono producendo sopratutto dei

veleni solubili, le così dette *esotossine*, che si ritrovano nei filtrati dei brodi culturali: Così il bacillo del tetano e della difterite. Di fronte a questi bacteri si devono sopratutto esaltare le attività antitossínogene dell' organismo e queste sono anche le malattie che più si prestano a una sieroterapia. Vi sono d'altra parte bacteri che invece non segregano, finchè vivono, dei veleni nel mezzo di cultura, ma le sostanze tossiche contengono nell'interno del corpo cellulare e solo colla morte di questo e suo conseguente disfacimento, le mettono in libertà: così detti bacteri ad *endotossine*, come il vibrione del colera ed il bacillo tifico. Di fronte a tali germi, l'esaltare le proprietà litiche del siero, può essere in molti casi, come Pfeiffer ha dimostrato, più dannosa che utile all' organismo infetto, perchè colla lisi bacterica si liberano le pericolose endotossine; ed una terapia razionale sembrava impossibile, finchè si ammise la impossibilità di immunizzare contro le endotossine. Oggi le ricerche di Macfayden, Besredka e di Kraus, sembrano aver accertato che anche la formazione di *antiendotossine* è possibile e che quindi un nuovo orizzonte pieno di promesse è aperto alla terapia vaccinale di malattie dovute a bacteri ad endotossine.

La distinzione fra le due classi di bacteri non è assoluta; pare esistano tipi di bacteri ad esotossine ed endotossine insieme, come il piocianeo ed il bacillo della dissenteria (Wassermann, Kraus),

Importante è ad ogni modo il tener presente come ogni microrganismo agisce con speciale meccanismo e come la vaccinazione debba quindi compiersi con metodi e su principî scientifici, esatti, individualizzati.

Le considerazioni generali che ho fatto fin qui, rappresentano

per me un necessario preambolo, per venire a discorrere di quel processo d'immunizzazione che da anni, fino dal 1896, viene studiato dal punto di vista teorico e pratico nell'Istituto da me diretto.

Tal metodo vale sopratutto contro i bacteri ad endotossine, perchè consiste nell'isolare dal corpo bacterico allo stato chimicamente puro o quasi una sostanza, che ne è un costituente importante, portatrice di proprietà tossiche, capace di dare origine ad una immunizzazione attiva, a formazione di veri anticorpi. Intendo parlare del *nucleoproteide,* corpo molto complesso, contenuto nelle cellule bacteriche come in tutte le cellule animali, che anzi delle cellule forma come l'intelaiatura essenziale, il substrato fondamentale ove si svolgono i fenomeni.

Per isolare dalle cellule bacteriche il nucleo proteide, che, come si è detto, contiene l'endotossina specifica o una delle endotosine specifiche, si coltivano i bacteri su larghe superficî solide, nel raccogliere la massa culturale, senza mescolanza di parti del terreno di cultura: punto questo importante, che elimina dal materiale vaccinale le mescolanze con sostanze eterogenee, inevitabili nell'uso di culture su terreni liquidi come punto di partenza per la fabbricazione dei vaccini; con potassa all'1 % si distruggono gli involucri dei corpi bacterici e si estraggono i nucleoproteidi; questi poi si precipitano dal liquido di estrazione con acido cloridrico o acetico; i nucleoproteidi così separati possono lavarsi su un filtro e conservarsi, sia allo stato secco, sia in soluzione alcalina (carbonato sodico 1 %).

Ora i nucleoproteidi tutti, sia quelli estratti dai bacteri che

in parte anche quelli estratti dai tessuti animali, hanno delle proprietà fisiche, chimiche e biologiche comuni e ben note: fra quelle biologiche ricordiamo: una proprielà coagulante, una chemiotattica positiva sui leucociti, un' azione pirogena, un'azione di arresto su cellule diverse dai leucociti, dotate di movimento (spermatozoi, epiteli vibratili), un'azione distruttiva e proteolitica sulle cellule di molti organi parenchimali. Ma, e questo è molto importante, i nucleoproteidi estratti dalle singole specie bacteriche hanno speciali e caratteristiche proprietà, sempre costanti per ciascuno di essi: così quello estratto dal bacillo della peste ha un'azione spiccata sull'apparato circolatorio, che ricorda le alterazioni funzionali di questo nella peste bubbonica, come Galeotti, Polverini, Federici ed io abbiamo dimostrato; anche al nucleoproteide del vibrione del colera, preparato da Galeotti e da Heller, Biell, Schmitz ed a quello del bacillo tifogeno e paratifico, spettano spiccate proprietà tossiche specifiche; anche le azioni biologiche del nucleoproteide del Melitensis sono state accuratamente studiate (Savagnone, Trambusti), così del piocianeo (Menini), di un bacillo del Mytilus (Zardo).

Quello che meglio di tutto dimostra la specificità dei nucleo proteidi bacterici, e ci fa riconoscere in essi la prevalenza di gruppi antigeni, è l'insieme dei risultati ottenuti nelle esperienze di laboratorio e sull'uomo, di vaccinazione con i nucleoproteidi.

Così potei dimostrare assieme a Galeotti ed a Malenchini, in ricerche compiute a Firenze ed a Bombay, che si possono ottenere gradi assai elevati di immunità attiva in vari animali da esperimento col nucleo proteide ricavato dal bacillo della pe-

ste; e tali risultati comparammo con gli effetti di altri metodi vaccinali, quello di Haffkine in ispecie; nè ci limitammo alle esperienze di laboratorio.

Lustig, Galeotti, Polverini, Malenchini, Dessy, hanno in India e nel Sud-America esperimentato largamente sull'uomo il valore preventivo di un tale vaccino, ed abbiamo dovuto con tutta imparzialità riconoscerne certi vantaggi, che ce lo hanno fatto preferire ad altri metodi, pure buoni, di vaccinazione. Come Galeotti ed io da un lato, Malenchini dall'altro, abbiamo esposto in recenti lavori riassuntivi pubblicati nello «Sperimentale» dell'anno scorso, coll'iniezione del nucleoproteide noi introduciamo la sostanza immunizzante in stato di relativa purezza, senza mescolanza di altri prodotti tossici del bacterio o di costituenti dei terreni di coltura; per di più bastano piccole quantità 1-2 mgr. di vaccino a conferire una immunità, che con vaccini fatti da culture liquide uccise semplicemente ed iniettate in toto, come quello di Haffkine, non basterebbero davvero a dare gli stessi effetti; nel nostro vaccino abbiamo poi le sostanze attive belle e liberate dai corpi bacterici mediante il processo di estrazione, non corpi bacillari ancora interi, onde più pronto è il riassorbimento e la conseguente reazione immunitaria. Di più il nostro vaccino è difficilmente inquinabile, si conserva bene allo stato secco, e si pesa e si dosa esattamente come un medicamento qualunque; anche quindi la sua azione generale e locale, la quale ultima non è più intensa che quella di altri vaccini, si lascia ben regolare, con criteri positivi e scientifici. Mentre nel liquido di Haffkine tutti gli elementi sono incogniti ed estremamente variabili per una infinità di «cause», abbiamo nel nostro nucleoproteide «una sostanza facil-

mente dosabile, di cui si possono con sicurezza stabilire le dosi fondamentali, necessarie per il raggiungimento dell'immunità».

In senso molto favorevole al nostro vaccino si è pronunziata una Commissione incaricata dall' Ufficio Federale Svizzero di Sanità di intraprendere ricerche comparative sui diversi vaccini antipestosi; anche questa Commissione riconobbe le spiccate proprietà specifiche del nostro vaccino: il nucleoproteide rappresenta esso stesso o almeno contiene l'endotossina specifica, e questa è capace di dare origine a formazione di anticorpi; che questi anticorpi siano contenuti nei sieri degli animali immunizzati, lo dimostra il fatto che questi hanno funzione spiccatamente preventiva e curativa, sia sugli animali che sull'uomo. La sieroterapia non entra nei limiti di questa comunicazione; mi limito a ricordare i buoni risultati ottenuti nella sieroterapia della peste bubbonica secondo il metodo della mia scuola da Wigorira, Dessy, Polverini in India ed in America, (per es., all'Arthur Road Hospital di Bombay); tali sieri degli animali immunizzati coi nucleoproteidi, contengono, pare, sostanze battericide ed antitossiche, certamente poi, secondo le ricerche di Franchetti, delle agglutinine specifiche.

Anche dal vibrione del colera Galeotti prima, poi Schmidt, Heller, Biell, ultimamente Schurupoff e Kravkoff hanno estratto un nucleoproteide con spiccate proprietà immunizzanti; i sieri acquistano potere bactericida ed agglutinante, la immunità attiva ottenuta dura assai a lungo. Tiberti ha immunizzati gli animali contro il carbonchio mediante il nucleoproteide ottenuto dai bacilli con il nostro metodo un po' modificato; le proprietà vaccinanti del nucleoproteide del bacillo del carbonchio furono confermate da Rossi. De Bonis ha preparato ed esperi-

mentato il nucleoproteide del bacillo del barbone; Del Conte quello del bacillo del tifo; Trambusti e Donzelli avrebbero conferito potere immunizzante al siero degli animali trattati con il bacillus Melitensis, che è causa della febbre mediterranea.

Da questa rapida scorsa risulta con tutta evidenza la possibilità di ottenere anticorpi mediante il trattamento degli animali o dell'uomo con constituenti chimicamente assai ben definiti della cellula bacterica, aventi una natura di vere endotossine.

Noi potremmo quasi vantare dei diritti di proprietà nella dimostrazione della funzione antigena di sostanze endobacteriche.

Si sa infatti come Pfeiffer attribuisse i fenomeni morbosi in varie malattie alle endotossine bacteriche che si liberano colla morte dei microrganismi, ma che non vengono secrete nel mezzo culturale durante la vita di questo; ora la siero e vaccinoterapia di tali malattie (colera, tifo, peste), sembrava trovasse difficoltà di applicazione pratica, in quanto che non si era riuscito ad immunizzare con queste endotossine, ottenute con varì mezzi, gli animali e l'uomo; quello che si otteneva per lo più erano degli anticorpi litici, i quali non agivano contro i veleni messi in libertà dal disfacimento dei bacteri. Ora le recenti ricerche, già più sopra ricordate e molto interessanti, di Kraus, Macfayden, Hahn ed altri, hanno condotto alla dimostrazione che veramente degli anticorpi si producono contro certe endotossine, in specie del colera, ottenute con metodí varî (congelazione e pressa idraulica di Buchner, autolisi, ecc.).

Ma già avanti le ricerche di questi autori, fino da 13 o 14 anni fa le ricerche mie e della mia scuola avevano condotto a risultati che, sebbene raggiunti con metodi un po' diversi ed

una tecnica quale le condizioni della dottrina dell' immunità a quell' epoca permettevano, in fondo venivano a dimostrare la stessa cosa: anche con costituenti tossici endobacterici, quali i nucleoproteidi, si può come coi bacteri interi e colle tossine solubili (per i microrganismi che ne producono) ottenere una immunità attiva, spiccata e duratura, a prova che quei costituenti sono veramente specifici e dotati di proprietà antigena.

Noi non vogliamo con queste considerazioni pretendere di diminuire l'importanza di altre ricerche ed altri metodi vaccinali: noi vogliamo solamente richiamare l' attenzione del Congresso su un procedimento assai semplice, scientificamente esatto, applicabile a varie specie bacteriche (vantaggio pratico questo non trascurabile), quale è il nostro della immunizzazione mediante nucleoproteidi.

Prima di finire, mi preme anche di far rilevare come le nostre ricerche sull'azione immunizzante dei nucleoproteidi bacterici siano in armonia colle dottrine più recenti sull'immunità: in fondo, isolando i nucleoproteidi, noi non abbiamo fatto altro che cercare di ottenere allo stato di massima purezza possibile quegli antigeni del corpo bacterico che servono a provocare una reazione immunitaria utile all'organismo. Che dei ricettori bacterici importanti siano legati alla complessa molecola dei nucleoproteidi, è molto verosimile, ove si pensi alla importanza fondamentale di queste sostanze nella biologia di tutti gli organismi. Mi auguro che ulteriori ricerche teoriche ed esperienze nel campo pratico, portino ad una conoscenza anche più profonda e ad un apprezzamento anche più intero della questione importante dell' immunizzazione mediante i nucleoproteidi.

La letteratura completa sull'argomento è stata pubblicata di recente nello «Sperimentale», Giornale di Biologia Normale e Patologia.—1910, Firenze.